

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0065648
Application Number

출원년월일 : 2002년 10월 26일
Date of Application OCT 26, 2002

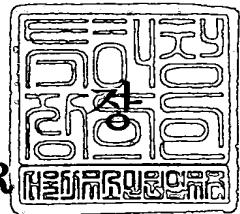
출원인 : 한국과학기술연구원
Applicant(s) KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY



2003 년 09 월 16 일

특허청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	5068
【제출일자】	2002. 10. 26
【국제특허분류】	A61K
【발명의 명칭】	진세노사이드 Rg3 또는 진세노사이드 Rh2를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성을 진세노사이드 Rg3 또는 진세노사이드 Rh2를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성을
【발명의 영문명칭】	COMPOSITION FOR INHIBITING GLUTAMATE-MEDIATED NEUROTOXICITY COMPRISING GINSENOSIDE Rg3 OR GINSENOSIDE Rh2
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술연구원
【출원인코드】	3-1998-007751-8
【대리인】	
【성명】	주성민
【대리인코드】	9-1998-000517-7
【포괄위임등록번호】	1999-023588-9
【대리인】	
【성명】	장수길
【대리인코드】	9-1998-000482-8
【포괄위임등록번호】	1999-023587-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임혜원
【성명의 영문표기】	RHIM, Hyewhon
【주민등록번호】	621003-2041910
【우편번호】	136-060
【주소】	서울특별시 성북구 돈암동 616-100번지 한신아파트 111-1108
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김선오
【성명의 영문표기】	KIM, Sunoh
【주민등록번호】	770718-1551016



1020020065648

출력 일자: 2003/9/20

【우편번호】 130-865
【주소】 서울특별시 동대문구 제기1동 1148-10번지 405호
【국적】 KR
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
주성민 (인) 대리인
장수길 (인)
【수수료】
【기본출원료】 19 면 29,000 원
【가산출원료】 0 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원
【합계】 29,000 원
【감면사유】 정부출연연구기관
【감면후 수수료】 14,500 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 글루타메이트 매개 신경독성 억제 효과를 갖는 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 20(S)-진세노사이드 Rg_3 또는 20(S)-진세노사이드 Rh_2 를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성물을 제공한다.

본 발명은 20(S)-진세노사이드 Rg_3 와 20(S)-진세노사이드 Rh_2 의 신경세포에 대한 작용 기전과 그 효능을 상세하게 구명한 것으로, 본 발명의 조성물은 우수한 신경독성 억제 또는 신경세포 보호 효과를 갖기 때문에 뇌외상, 뇌졸중, 뇌허혈, 중풍, 간질, 알츠하이머병 또는 헌팅تون병 등의 뇌질환 치료에 사용될 수 있다.

【대표도】

도 5

【색인어】

인삼, 진세노사이드, 20(S)-진세노사이드 $Rg3$, 20(S)-진세노사이드 $Rh2$, 신경독성, 뇌허혈, 해마신경세포

【명세서】

【발명의 명칭】

진세노사이드 Rg3 또는 진세노사이드 Rh2를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성물 {COMPOSITION FOR INHIBITING GLUTAMATE-MEDIATED NEUROTOXICITY COMPRISING GINSENOSIDE Rg3 OR GINSENOSIDE Rh2}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 Ca^{2+} -영상화 기술을 이용하여 측정한 NMDA 수용체 활성 측정 그래프이고, 도 1b는 동일한 방법으로 인삼 총 사포닌 성분(GTS)과 기존에 알려진 NMDA 수용체 길항제인 D-APV (D(-)-2-아미노-5-포스포노펜탄산)를 이용하여 측정한 NMDA 수용체 활성 측정 그래프.

도 2는 인삼의 주요 진세노사이드 성분 10종 (C-20 위치의 이성질체를 분리하지 않은 상태)을 도 1의 방법으로 검색한 후 가장 우수한 성분을 전세포 패치 클램프 (whole-cell patch-clamp) 방법을 이용한 NMDA 수용체 매개 유입 전류로 확인한 결과를 보여주는 그래프.

도 3은 효소를 이용한 신경독성 분석법 (MTT assay)에서 진세노사이드 Rg3의 신경세포 보호 효과를 보여주는 그래프.

도 4는 생체내에 존재하는 미생물에 의해 대사되는 20(S)-진세노사이드의 분해도.

도 5는 도 4에 도시된 총 9종의 20(S)-진세노사이드의 NMDA 수용체 매개 칼슘 유입 저하 효과를 보여주는 그래프.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 본 발명은 글루타메이트 매개 신경독성 억제 효과를 갖는 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 20(S)-진세노사이드 Rg₃ 또는 20(S)-진세노사이드 Rh₂를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성물을 제공한다.

<7> 파낙스 진생 (*Panax ginseng* C.A. Meyer (*Araliaceae*))의 뿌리인 인삼은 아시아뿐만 아니라 세계적으로 가장 많이 사용되는 생약 중의 하나이다. 이러한 인삼의 생물학적 효능을 갖는 성분은 진세노사이드 (ginsenoside) 또는 인삼 사포닌으로 알려진 화합물로 30종 이상의 진세노사이드가 인삼에 분리되어 그 구조가 알려져 있다 (Liu, C.X. 등, *J. Ethnopharmacol.* 36, 27-38, 1996 및 Baek, N.I. 등, *Planta Med.* 1996, 62, 86-87, 1996 참조). 그 대표적 예로 진세노사이드-Ra, -Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd, -Re, Rf, -Rg₁, -Rg₂, -Rg₃, -Rh₁, -Rh₂ 등이 있다.

<8> 생체내의 인삼 사포닌의 다양한 효능 중 최근의 연구들은 중추신경에 대한 인삼의 유익한 효능들에 대하여 보고하기 시작하였다. 학습과 기억력에 대한 동물모델에서 인삼은 학습 및 기억력에 효과를 나타냄이 밝혀졌다. 특히 스코폴아민(scopolamine)으로 손상된 동물모델이나 나이에 따라 약해지는 기억력, 기억형성에 가장 중요한 부위로 알려진 해마 (hippocampus) 신경세포의 손상에 의한 기억력 감퇴를 인삼이 완화시키는 것으로 알려지고 있다 (Hsieh, M.T. 등, *Phytother. Res.* 14, 375-377, 2000, Wesnes, K.A., Ward 등, *Psychopharmacology (Berl)* 152, 353-361, 2000 및 Zhong, Y.M. 등, *Physiol. Behav.* 69, 511-525, 2000 참조). 인삼의

이러한 기억력에 대한 효과는 인삼 추출물을 포함하는 기억력 증진제로 출원된 바 있다 (한국 특허 출원 제2000-4715호).

<9> 학습 및 기억력에 대한 효과 이외에, 뇌출혈, 뇌출증, 뇌허혈과 같은 뇌질환에 중요한 인삼의 유익한 효과가 보고되었다. 외부의 뇌 손상이나 뇌혈관의 폐색에 의해 유발되는 뇌손상 시에는 뇌의 대표적 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트의 항상성이 파괴되어 글루타메이트 유발 신경독성으로 신경세포가 죽어간다. 심근 또는 전뇌 혈관 폐색에 의해 유발되는 뇌허혈 동물 모델에 인삼을 처리한 결과 신경세포 사멸을 막아준다는 보고들이 있다 (Wen, T.C. 등, *Acta. Neuropathol. (Ber)* 91, 15-22, 1996 및 Maffei Facino, R. 등, *Planta Med.* 65, 614-619, 1999 참조).

<10> 이러한 인삼의 신경세포 보호 효과는 인삼 성분 중 하나인 진세노사이드 Rb₁이 뇌허혈에서 가장 손상을 잘 받는 해마세포의 신경세포 사멸 억제효과와 배양된 피질 뉴런에서 글루타메이트에 의한 신경독성을 진세노사이드 Rb₁과 Rg₃가 억제한다는 사실로 더 확실하게 되었다 (Lim, J.H. 등, *Neurosci Res.* 28, 191-200, 1997 및 Kim, Y.C. 등, *J. Neurosci. Res.* 53, 426-432, 1998 참조).

<11> 그러나 이러한 인삼의 중추신경에서의 유익한 효과들이 발표됨에도 불구하고 그 자세한 기전은 현재까지 밝혀지고 있지 않고 있으며, 각 성분의 상이한 효과가 아직 밝혀지지 않은 상태이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<12> 본 발명의 목적은 인삼의 진세노사이드의 글루타메이트 유발 신경독성 억제 기작을 밝혀내고, 인삼의 진세노사이드 중 신경세포에서 글루타메이트 유발 신경독성에서 가장 중요한

NMDA 수용체에 대한 우수한 억제 효능을 갖는 진세노사이드를 직접 스크리닝하여 이를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 본 발명자들은 글루타메이트의 독성 억제 효능을 갖는 인삼의 진세노사이드를 스크리닝하기 위한 연구를 거듭하여 20(S)-진세노사이드 Rg₃와 진세노사이드 Rg₃의 대사산물인 20(S)-진세노사이드 Rh₂가 글루타메이트 수용체의 아형인 NMDA 수용체에 대한 우수한 억제 효능을 갖는다는 사실을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

<14> 따라서, 본 발명은 글루타메이트 매개 신경독성 억제 효과를 갖는 조성물, 보다 구체적으로 20(S)-진세노사이드 Rg₃ 또는 20(S)-진세노사이드 Rh₂를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성물을 제공한다.

<15> NMDA 수용체를 통한 글루타메이트 신경독성은 신경외상, 뇌졸중, 뇌일혈시 신경세포의 사멸을 유발시켜 뇌신경의 비가역적 손상을 가져오는 가장 주요한 기전으로 (Skaper S.D. 등, Ann N Y Acad Sci. 939, 11-22, 2001 및 Massieu L. & Garcia O. Neurobiology (Bp) 6, 99-108, 1998), 글루타메이트 매개 신경독성 억제 효과를 갖는 본 발명의 조성물은 외상, 뇌졸중, 뇌허혈, 중풍을 포함하는 신경질환 및 글루타메이트 수용체 과다 활성으로 유발되는 간질이나 헌팅تون병 같은 뇌질환의 치료에 사용될 수 있다.

<16> 본 발명은 20(S)-진세노사이드 Rg₃ 또는 20(S)-진세노사이드 Rh₂가 글루타메이트, 특히 NMDA 수용체의 특이 억제제로의 우수한 효능을 갖는다는 사실을 밝힌 것으로, 본 발명과 가장 근접한 선행 연구로서 배양된 피질세포에서 진세노사이드 Rb₁과 진세노사이드 Rg₃가 신경세포 사멸을 억제한다는 결과가 유일하게 있으나 (Kim, Y.C. 등, J. Neurosci. Res. 53, 426-432,

1998 참조), 이 선행 연구에서는 20(S)-진세노사이드 Rg₃와 20(R)-진세노사이드 Rg₃의 혼합물에 대해서만 그 효과를 시험하였을 뿐으로, 본 발명에서와 같이 혼합물이 아닌 20(S)-진세노사이드 Rg₃가 우수한 글루타메이트 매개 신경독성 억제 효과를 갖는다는 것은 제시한 바 없다.

<17> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<18> 본 발명에서는 외부자극에 의한 뇌 손상이나 뇌혈관의 폐색에 의해 유발되는 뇌경색, 뇌출혈, 중풍 등에 관여하는 글루타메이트 유발 신경독성의 초기 기작을 인삼의 주요 진세노사이드 10종에 대하여 조사하였다. 조사 시스템은 신경세포의 병리적 현상에서 가장 먼저 신경세포 사멸이 관찰되고 학습과 기억력 모델에서 가장 중요한 부위로 알려진 해마 신경을 흰쥐의 태아 18일부터 생후 1일의 상태에서 분리한 후 1주일 이상 시험관내(*in vitro*) 조건에서 배양된 세포를 사용했다.

<19> 또한, 신경세포에서 가장 대표적인 신경전달물질인 글루타메이트는 NMDA 수용체, 비NMDA 수용체, 대사성 글루타메이트 수용체 3 가지를 통하여 작용한다. 글루타메이트 유발 신경독성에는 세포 안으로 과량의 칼슘을 유도하는 NMDA 수용체가 가장 중요하므로 진세노사이드 성분들을 NMDA 수용체 활성시 동반되는 칼슘 유입은 세포내 Ca^{2+} -영상화 기술로, NMDA 수용체 매개 이온 유입은 전세포 패치 클램프 기술로 초기 기전을 조사한 후, 기존의 신경독성 분석법인 효소분석법 (MTT assay)으로 결과를 확인하였다.

<20> 본 발명에서 확인한 바에 따르면, 20(S)-진세노사이드 Rg₃ 및 20(S)-진세노사이드 Rh₂가 NMDA 수용체 매개 칼슘 유입을 효과적으로 억제하는 것으로 밝혀졌다.

<21> 따라서, 20(S)-진세노사이드 Rg₃ 또는 20(S)-진세노사이드 Rh₂를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성물은 외상, 뇌출중, 뇌허혈, 중풍을 포함하는 신경질환 및 글루타메이

트 수용체 과다 활성으로 유발되는 간질이나 헌팅تون병 같은 뇌질환의 치료에 효과적으로 사용 될 수 있다.

<22> 본 발명의 조성물은 바람직하게는 약제학적인 분야에서 통상적인 방법에 따라 경구 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 주사제, 시럽제 등의 형태로 제형화시켜 투여한다.

<23> 적합한 경구 투여용 제형에는 경질 및 연질 캡슐제, 정제, 산제 등이 포함된다. 이러한 경구투여용 제제에는 약물학적 활성 성분 이외에 하나 이상의 약제학적으로 불활성인 통상적인 담체, 예를 들면 전분, 락토스, 카올린 등의 부형제, 물, 젤라틴, 아라비아 고무, 트라가칸타 고무 등의 결합제, 전분, 나트륨 알기네이트 등의 봉해제, 탈크, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 유동 파라핀 등의 활탁제와 같은 추가의 첨가제 성분들이 포함될 수 있다.

<24> 또한, 본 발명의 의약 조성물은 흡입약, 설하정, 국소주입제, 국소도포제, 근육주사제, 피하주사제, 피내주사제로서도 사용가능하다.

<25> 본 발명에 따른 조성물의 정맥 투여 조성물은 통상의 방법에 따라 제제화할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물은 동결 건조 결정을 생리 식염수, 증류수, 인산 완충액 등에 용해시킴으로써 정맥내 투여 제제로 만들 수 있으며, 지방 유제, 리포좀 제제로서도 사용가능하다.

<26> 본 발명에 따른 조성물의 1일 투여 용량은 투여 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라지지만, 성인을 기준으로 할 때 일반적으로는 활성 성분 5 내지 1000 mg, 바람직하게는 10 내지 500 mg, 보다 바람직하게는 50 내지 500 mg을 1일 1 내지 2회 분할 하여 투여한다. 그러나, 투여량은 뇌신경 질환 분야의 전문의의 판단에 따라 상기 용량 이외의 투여량을 투여할 수 있다.

<27> 본 발명의 조성물에 포함되는 진세노사이드는 생약인 인삼에서 추출한 성분으로서 인체에 대한 사용 안전성을 갖는다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

<28> 실시예 1: 해마 신경세포 분리 및 배양법

<29> 태아 18일부터 생후 1일된 흰쥐의 해마 신경조직을 해부 현미경에서 분리하여 0.05% 파파인 효소를 레이보비츠(Leibovitz) L-15 배지에 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 이어서, 효소용액을 수회 세척한 후 파스퇴르 피펫의 공극 크기를 조절하여 기계적으로 분리한 해마 단일 신경세포를 폴리-L-리신 (0.5 mg/ml)으로 처리한 커버 슬립에 1.5×10^5 세포/ml로 배양하였다.

<30> 세포는 0.5 mM L-글루타민, 25 μ M 글루타메이트, 25 μ M 2-머캅토에탄올, 100 U/ml 폐니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 Neurobasal/B27 배양용액에서 배양하였다. 1주에 2회씩 글루타메이트가 첨가되지 않는 배지로 1/2씩 교환하면서 배양하여 배양 7-15일 후 실험에 사용하였다.

<31> 실시예 2: 세포내 칼슘 농도 측정

<32> 아세톡시메틸-에스테르 형태의 푸라-2 (푸라-2/AM; 분자 프로브, 미국 오레건주 소재의 유진(Eugene)사 제품)를 형광성 Ca^{2+} 표지물로 사용하였다. HEPES 완충용액 (단위 mM: 150 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, 10 글루코스, pH 7.4)에서 5 μ M 푸라-2/AM과 0.001% 플루로닉(Pluronic) F-127와 함께 해마 신경세포를 실온에서 40 내지 60분간 1차 배양하여 표지한 후 HEPES 완충용액으로 수회 세척하였다. 10분간 안정화시킨 후에 도립 현미경을 사용하여 세포내 칼슘 이온 농도 변화를 측정하였다.

<33> 구체적으로, 크세논 램프를 비추어 컴퓨터 제어 필터 휠(computer-controlled filter wheel) (미국 캘리포니아주 소재의 셔터 인스투루먼트 (Sutter Instruments) 제품)에 의해 여기 파장 (340 nm 및 380 nm)을 선택적으로 세포에 노출시켰다. 매 2초 간격으로 데이터를 얻었으며 빛이 노출되는 사이에 셔터를 설치하여 세포에 주는 광독성을 방지하였다. 515 nm 고 대역 통과 여파기(long-pass filter)를 통과하여 들어온 방출 형광(emitter fluorescence light)은 냉각 CCD 카메라를 지나 디지털 형광 분석기에 의해 비율값과 세포내 유리 Ca^{2+} 농도 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 값으로 전환하였다. 모든 영상 데이터와 분석은 Universal Imaging software (미국 펜실베니아주 소재의 웨스트 체스터 (West Chester) 제품)를 이용하였다.

<34> 실시예 3: 전기 생리학적 방법을 이용한 NMDA 수용체 매개 막전류 측정

<35> 천공 패치 클램프(perforated patch-clamp) 기법을 이용한 전체 세포 전압 클램프 기록을 수행하였다. 실온에서 해마 신경세포의 세포막과 전극 사이에 기가옴 밀봉(gigaohm seal)이 형성되어 전류가 밖으로 흐르지 않게 한 후 막전위를 고정하고 10분 정도 기다린 후 세포막 전류를 측정하였다. 패치 전극의 저항값은 3-4 M Ω 을 유지하였고, 내부용액을 120 글루콘산 칼륨, 20 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7.4 (단위: mM)으로 채워 넣었다.

<36> 세포막에 1가 이온만 통과하게 하여 전기를 통하여 하는 용액으로서 니스타틴(Nystatin) 원액 (25 mg/ml)을 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석하여 내부용액에 첨가하였다. 세포막 전류 측정 용액 (단위: mM, 150 NaCl, 5 KCl, 2CaCl₂, 10 HEPES, 10 글루코스, pH 7.4)에는 필요에 따라 NMDA 수용체 활성을 위하여 0.001 mM의 글리신을 첨가하였고, Mg²⁺을 제거하여 사용하였다. 세포막 전압 기록은 EPC-9 증폭기와 Pulse/Pulsefit software (HEKA, Germany)를 이용하여 측정하였다.

<37> 실시예 4: NMDA 수용체 매개 칼슘 유입을 이용한 NMDA 수용체 억제제 검색

<38> 해마 신경세포에서 NMDA 수용체 활성을 통한 NMDA 수용체 억제제 스크리닝 방법은 실시 예 2에서 설명한 바와 같이 fura-2/AM이라는 칼슘의존성 염료를 사용한 Ca^{2+} -영상화 기술을 이용하였다.

<39> 단기적으로 NMDA를 투여할 때마다 NMDA 수용체 활성화는 세포내 칼슘 유입을 야기한다. 따라서, 매 4-5분씩 12번 이상 NMDA를 실시예 1에서 준비한 해마 신경세포에 투여하여 세포내 칼슘 유입을 관찰한 결과, 탈감각없이 일정한 값을 유지하고 공지의 NMDA 수용체 길항제인 D-APV와 인삼 총 사포닌 성분(GTS)을 해마 신경세포에 처리한 경우에는 Ca^{2+} 농도가 현저하게 억제되기 때문에(도 1), 인삼 성분의 NMDA 수용체 억제제 스크리닝 시스템으로 사용하였다.

<40> 인삼의 주요 사포닌 성분 중 10종의 진세노사이드 (진세노사이드- Rb_1 , $-Rb_2$, $-Rc$, $-Rd$, $-Re$, $-Rf$, $-Rg_2$, $-Rg_3$, $-Rh_1$, $-Rh_2$)를 1차 검색으로 C-20 위치의 이성질체를 분리하지 않은 상태로 검색한 결과 진세노사이드 Rg_3 의 NMDA 수용체 억제 효능이 다른 진세노사이드 성분들에 비해 월등히 뛰어남을 밝혀졌다 (도 2a 및 2b).

<41> 진세노사이드 Rg_3 의 NMDA 수용체 억제 효능은 칼슘의 유입뿐만 아니라 NMDA 수용체 매개 전류 유입을 직접 측정할 수 있는, 실시예 3에 기재된 전기생리학적 전세포 패치 클램프 방법으로도 확인되었고(도 2d), IC_{50} 농도 $3.8 \mu M$ 로 농도 의존적으로 나타남을 알 수 있었다 (도 2c).

<42> 도 2a 내지 2c의 실험은 위에서 언급한 바와 같이 NMDA를 배양 해마세포에 투여했을 때 (5-10 초) NMDA 활성으로 생기는 칼슘 유입을 Ca^{2+} -영상화 기술로 측정하였고, 도 2d는 이러한 Ca^{2+} 이온 유입 이외에 NMDA 수용체 활성으로 세포 내에 NA^+ 이온 등의 유입으로 형성된 내향 전류를 진세노사이드 Rg_3 이 억제함을 보여주는 결과로서, 도 2의 결과는 진세노사이드 Rg_3 가 NMDA

수용체 활성시 유입되는 이온들의 유입을 차단함으로 그 억제작용을 나타냄을 제시하고 있다.

사용된 진세노사이드 투여량은 농도 의존적 실험을 제외하고 모든 경우 10 μM 이었다.

<43> 신경 세포에서 NMDA에 의해 세포 흥분 독성에 의한 세포의 생존율을 측정하기 위하여, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 분석을 시행하였다. 1차 배양한 흰쥐 해마 신경세포를 24웰 플레이트에 6-14일간 배양한 후 1 μM 의 글리신이 포함된 Mg^{2+} 무첨가 완충액을 사용하여 1분간 GTS (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 Rg₃ (10 μM)를 전처리한 후 10분간 NMDA를 동시 처리하고 다시 정상 배양액으로 교환하였다. 처리 24시간 후에 PBS 녹인 MTT (1 mg/ml)를 50 μl 씩 직접 배양한 세포에 처리하였다. MTT 처리 4시간 후 상층액을 제거하고 대사된 포르마잔을 디메틸су포시드(DMSO) 100 μl 에 용해시켰다. 자동 분광광도계 플레이트 판독기 (Automated spectrophotometric plate reader)를 이용하여 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

<44> 상기 MTT 분석법으로 분석한 결과, NMDA 수용체 길항제인 D-APV, 인삼의 총 사포닌 성분 (GTS), 진세노사이드 Rg₃가 NMDA 유발 신경독성에 대한 세포 생존성을 유효하게 증가시키는 것 이 입증되었다 (도 3).

<45> 인삼에는 30여종의 진세노사이드가 자체로 존재하지만 그 중의 여러 성분은 그 전구체에 의하여 생체 내에서의 대사과정에서 추가 생성되기 때문에(도 4), 이러한 1차 결과를 바탕으로 사람의 위장에 존재하는 미생물에 의한 대사산물, 특히 홍삼에서 특이적으로 존재하는 성분들을 중심으로 C-20 위치의 (S)-형태의 순수 화합물만을 해마 신경세포의 NMDA 수용체에 대한 효능을 추가로 조사하였다.

<46> 진세노사이드 성분의 C-20 위치의 (S)-형태의 순수 화합물 검색에는 20(S)-진세노사이드-Rb₁, -Rd, -Rg₁, -Rg₃, -Rh₁, -Rh₂, 20(S)-프로토파낙사디올 (protopanaxadiol), 20(S)-프로토파낙사트리올 (protopanaxatriol) 및 화합물 K의 총 9가지의 화합물을 이용하여 도 2a 내지 2c의 실험 방법과 동일한 방법으로 실험을 수행하였고, 그 중 NMDA 수용체 활성에 가장 우수한 효과를 나타내는 화합물은 20(S)-진세노사이드 Rg₃와 20(S)-진세노사이드 Rh₂임이 밝혀졌다 (도 5).

<47> 하기 표 1은 인삼 총 사포닌 성분 (GTS), C-20 위치의 이성질체를 분리하지 않은 진세노사이드 Rg₃과 진세노사이드 Rh₂, 20(S)-진세노사이드 Rg₃, 20(S)-진세노사이드 Rh₂의 NMDA 수용체 매개 칼슘 유입 억제를 비교한 것으로서, 진세노사이드 Rg₃는 C-20 위치의 이성질체가 S-형 또는 R-형이든 또는 그 혼합물이든 생체 효능은 동등한 반면, 진세노사이드 Rh₂는 혼합물보다 20(S)-형이 월등한 효과를 나타내었다.

<48> 【표 1】

	농도	NMDA 수용체 매개 $[Ca^{2+}]_i$ 유입 억제율(%) ¹
인삼 총 사포닌 함량(GTS)	100 $\mu g/ml$	62.0 \pm 1
진세노사이드 Rg ₃ (20(S)-형과 20(R)-형의 혼합물)	10 μM	70.0 \pm 5
20(S)-진세노사이드 Rg ₃	10 μM	63.6 \pm 0
진세노사이드 Rh ₂ (20(S)-형과 20(R)-형의 혼합물)	10 μM	18.6 \pm 7***
20(S)-진세노사이드 Rh ₂	10 μM	63.3 \pm 6

¹ 배양된 쥐 해마 신경세포에서 시험,
*** P<0.001, 20(S)-진세노사이드 Rh₂에서 측정한 값과 비교치.

【발명의 효과】

<49> 본 발명은 20(S)-진세노사이드 Rg_3 와 20(S)-진세노사이드 Rh_2 의 신경세포에 대한 작용 기전과 그 효능을 상세하게 구명한 것으로, 본 발명의 조성물은 우수한 신경독성 억제 또는 신경세포 보호 효과를 갖기 때문에 뇌외상, 뇌졸중, 뇌허혈, 중풍, 간질, 알쓰하이머병 또는 헌팅تون병 등의 뇌질환 치료에 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

20(S)-진세노사이드 Rg_3 또는 20(S)-진세노사이드 Rh_2 를 포함하는 글루타메이트 매개 신경독성 억제 조성물.

【청구항 2】

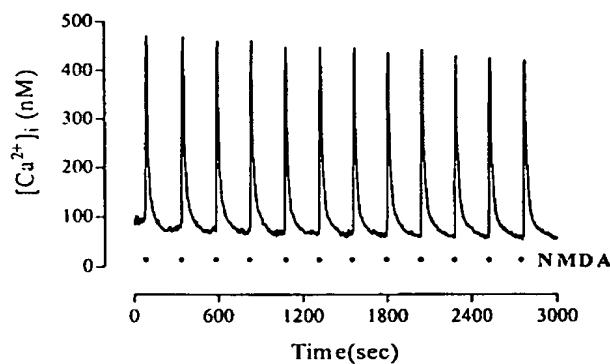
제1항에 있어서, 20(S)-진세노사이드 Rh_2 를 포함하는 조성물.

【청구항 3】

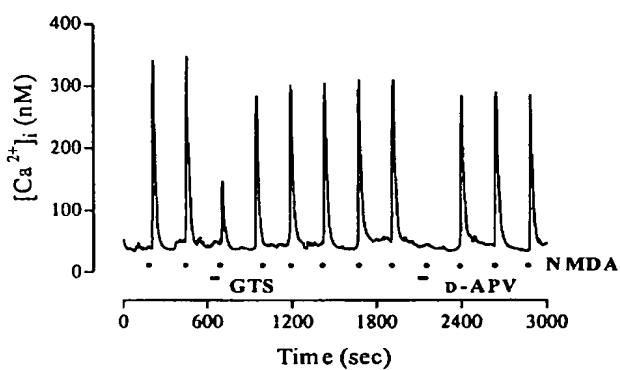
제1항에 있어서, 뇌외상, 뇌졸중, 뇌허혈, 중풍, 간질, 알쓰하이머병 또는 헌팅تون병 치료용 조성물.

【도면】

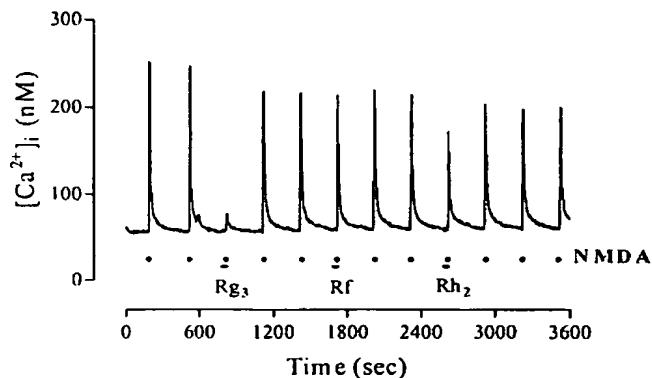
【도 1a】



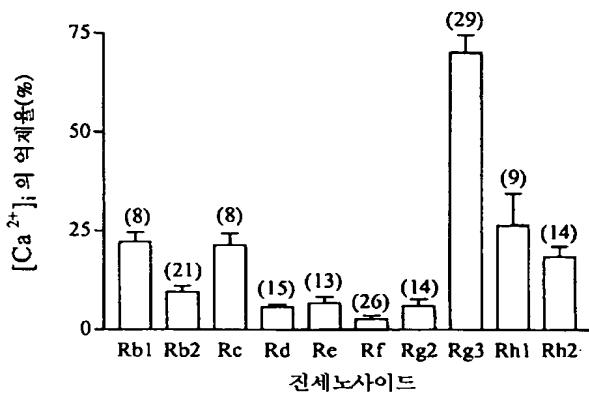
【도 1b】



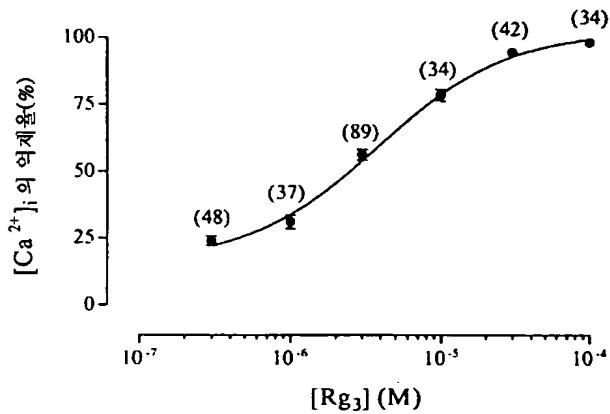
【도 2a】



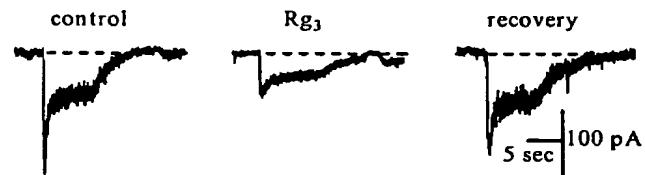
【도 2b】



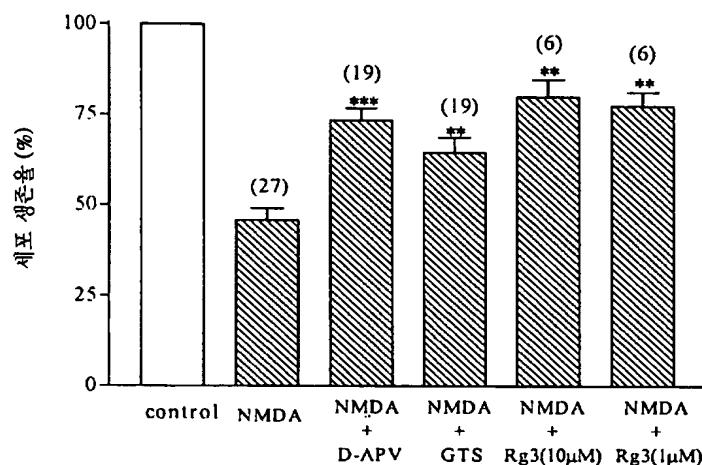
【도 2c】



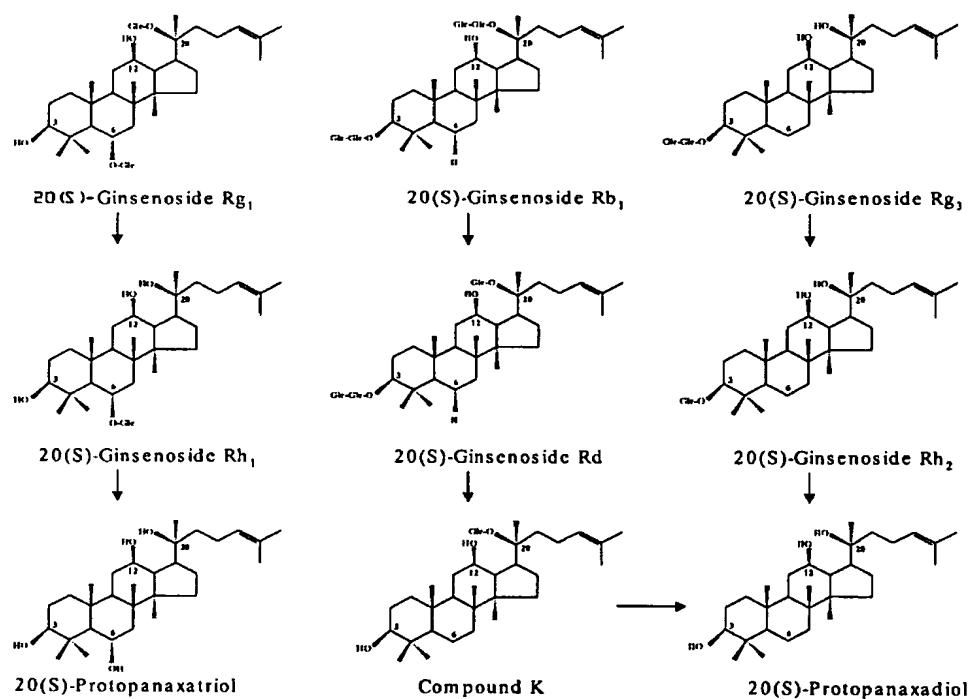
【도 2d】



【도 3】



【도 4】



【도 5】

